

ミトコンドリア COI 遺伝子塩基配列に基づく 日本産カイヤドリウミグモの集団遺伝学的解析

Population genetic analysis of a sea spider, *Nymphonella tapetis* (Pycnogonida, Ascorhynchidae) in Japan based on the mitochondrial COI gene sequence

五十嵐陽大¹・玉置雅紀²・宮崎勝己^{1*}

Yota Ikarashi, Masanori Tamaoki, Katsumi Miyazaki*

¹新潟大学大学院自然科学研究科, 新潟県新潟市西区五十嵐2の町8050

²国立環境研究所福島支部, 福島県田村郡三春町深作10-2

¹Graduate School of Science and Technology, Niigata University, 8050 Ikarashi 2 no-cho, Nishi-ku, Niigata 950-2181, Japan. ²Fukushima Branch, National Institute for Environmental Studies, 10-2 Fukasaku, Miharu, Tamura, Fukushima 963-7700, Japan.

*Corresponding author; e-mail: miyazaki@env.sc.niigata-u.ac.jp

Abstract

Nymphonella tapetis is a sea spider showing a larval endoparasitism on Manila clam (Asari) and some other bivalves. A large-scaled outbreak of the species occurred in Tokyo Bay in 2007 and caused serious damage to the Asari fishery. The species has been recorded afterward in several places in Japan and seemed to be expanding its distribution. In the present study, we conducted a population genetic analysis of *N. tapetis* using mtDNA COI sequences from the populations of five localities in Japan: Tokyo Bay (Chiba Prefecture), Mikawa Bay (Aichi Pref.), Matsukawaura (Fukushima Pref.), Tateyama (Chiba Pref.), and Misaki (Kanagawa Pref.). Phylogenetic tree from a partial COI sequence (562 bp) robustly supported a monophyly of *N. tapetis* of these localities. Parsimony haplotype network analysis showed the two genetic lineages among these populations: the Tokyo Bay (Tokyo Bay, Mikawa Bay and Matsukawaura) and the Tateyama (Tateyama and Misaki) lineages. The lower average nucleotide sequence divergence of the Tokyo Bay lineage suggests its younger history than another lineage. As the localities of the Tokyo Bay lineage are remotely separated each other and the *N. tapetis* larvae lack the planktonic stages, they are considered sharing a common source such as a recent commercial circulation of Manila clam. Although Tateyama and Misaki are geographically much closer to Tokyo Bay compared to Mikawa Bay and Matsukawaura, the migration between the Tateyama + Misaki population and the Tokyo Bay population seems to be an unlikely event.

Key words: *Nymphonella tapetis*; Pycnogonida; Manila clam; parasitism; phylogenetics; population genetics; COI

緒言

海産節足動物の一種であるカイヤドリウミグモ *Nymphonella tapetis* Ohshima, 1927 は、幼生時代に二枚貝に内部寄生して貝の体液をエサとして成長し、成体になった後に貝の外へ出て自由生活を行うという特異な生活史を持つ (Ohshima 1935; 大島 1939; 宮崎ら 2010)。

2007～2009 年にかけて千葉県「東京湾」・福島県「松川浦」・愛知県「三河湾」で次々と本種が大量発生し、寄生に起因すると考えられるアサリなど有用二枚貝のへい死や不快生物としての風評被害などの漁業被害が相次いで引き起こされた (鳥羽ら 2019; 宮崎・山田 2019)。これまで行われた集団遺伝学的研究では、

互いに遠く離れた上記の3地域の個体群は同祖個体群からの派生であることが示唆されている(張ら 2012)。本種は幼生・成体とも浮遊適応を欠き、分散能力は低いと考えられることから、このような異所的大発生の背景として、アサリ流通などの人為的要因を考慮する必要が指摘されている(山田ら 2019)。

更に最近では、大規模発生が起きた3地域の他に、カイヤドリウミグモが新たに確認された地域が報告されている。千葉県「館山」では2012年4月、神奈川県「三崎」では2014年1月以降、自由生活をする本種成体が数個体ずつ採集されている(宮崎・山田 2019)。大量発生した3地域に比べ、これらの新たに発生が確認された地域では出現頻度が非常に小さい上に、貝類漁業や潮干狩りも盛んではない。そのため、これらの地域では古くから細々と個体群が維持されており、これまでその存在が見過ごされていたという可能性が指摘されている(宮崎・山田 2019)。

ウミグモ類の集団遺伝学的研究については、大型種や多肢種(歩脚が通常種の4対より多い種)を多く産し、古くより研究者の注目を集めている南極産の種に研究例が集中している(例えば Krabbe et al. 2010; Soler-Membrives et al. 2017; Dömel et al. 2019)。南極以外の地域では小型種が多いこともあり研究例が非常に少ないが(Sabroux et al. 2017)、カイヤドリウミグモは大規模な漁業被害の発生という特殊事情もあって温帯性小型種としては集団遺伝学的知見が最も蓄積された種といえる(水産庁 2009; 張ら 2012; 宮崎ら 2019)。しかしながら各個体群の由来、特にどのような移入経路をたどり各地域に侵入し大発生に至ったかを解明するには、更なる集団遺伝学的知見の蓄積が必要不可欠である。

本研究は、本種の大発生が起こった3つの地域(東京湾・松川浦・三河湾)と新たに発生が確認された地域(館山・三崎)の各個体群の遺伝的関係を明らかにし、特に東京湾湾口部に位置する館山・三崎の両地域が東京湾内への移入元となる可能性を検討することを目的に、ミトコンドリア(mt)DNA中にあるcytochrome oxidase I (COI)領域の塩基配列を用いた集団遺伝学的解析を行った。本種の大発生が起こった3つの地域の個体群が国内移入であれば、館山・三崎と3つの地域の個体群は同一のハプロタイプ集団となると予測される。一方で、全く異なるハプロタイプであるとすれば、国内の館山・三崎以外の地域からの移入、もしくは、国外侵入集団(外来生物)であることを推測することができる。

材料および方法

試料入手

本研究では、国内2地域(館山及び三崎)で採集された標本を用いた(Fig. 1)。館山標本については、お茶の水女子大学湾岸生物教育研究センターが所有する採集船シースター及び同センターが備船した保坂丸によるドレッジ調査で得られた砂泥基質をソーティングして採集し、70~100%エタノール中に保存した成体計10個体を試料とした(Table 1)。三崎標本については、東京大学三崎臨海実験所が行ったドレッジ調査で採集され、70%エタノール中に保管されていた成体計4個体を試料とした(Table 1)。

集団遺伝学的解析

各試料から歩行肢を原則として二本切り出し、十分にホモジェナイズした後、DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN 社)を用いDNA

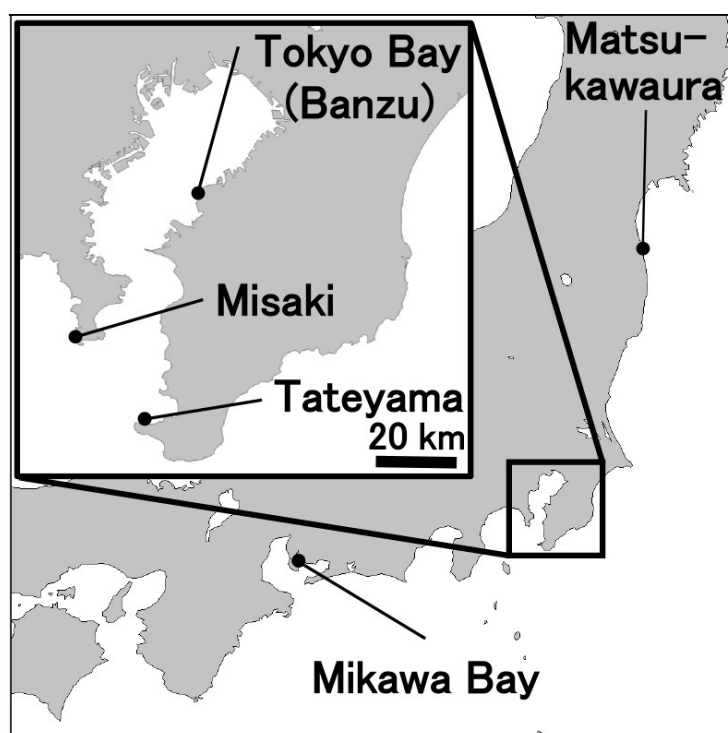


Fig. 1. Sampling localities of sea spider *Nymphonella tapetis* in Japan. Nucleotide sequence data of sea spider samples in Matsukawaura, Tokyo Bay and Mikawa Bay are from previous study (Chow et al. 2012).

Table 1. Collection information of *Nymphonella tapetis* individuals captured at Tateyama (T) and Misaki (M).

ID	Date & Year	Latitude/Longitude or Location	Depth (m)
T20	23 May, 2018	34°58.971N, 139°49.051 E	10.0
T21	5 March, 2019	34°59.172N, 139°48.837 E	13.2
T23	24 April, 2019	34°58.919N, 139°49.025E	7.6
T24	24 April, 2019	34°58.919N, 139°49.025E	7.6
T26	24 April, 2019	34°58.919N, 139°49.025E	7.6
T28	24 April, 2019	34°58.919N, 139°49.025E	7.6
T29	24 April, 2019	34°58.919N, 139°49.025E	7.6
T30	26 April, 2019	34°58.962N, 139°49.022E	7.4
T31	26 April, 2019	34°59.013N, 139°49.117E	7.3
T32	26 April, 2019	34°59.013N, 139°49.117E	7.3
M1	16 May, 2014	Koajiro Bay	12.0
M2	24 January, 2014	Koajiro Bay	8.4
M3	24 January, 2014	Koajiro Bay	8.4
M4	20 March, 2015	Moroiso	unrecorded

抽出液を作成した。

下記プライマーセット (張ら 2012) と条件により PCR 増幅を行った。

• Forward プライマー : UMCOI-1F2
[5' -ACAAATCATAAAGAYATTGG-3']

• Reverse プライマー : UMCOI-2R

[5' -TGATGAGCTCAAACAATAAA-3']

• 初期熱変性 95°C, 5 分 • [熱変性 95°C, 1 分;
アニーリング 45°C, 30 秒 (T21 のみアニーリング温度を 40°Cに変更); 伸長反応 72°C, 1 分]

35 サイクル・最終伸長反応 72°C, 5 分

館山標本 10 個体、三崎標本 4 個体の mtDNA COI 領域の塩基配列 562 bp を DNA シーケンサー ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社) を用いて決定した。東京湾・三河湾・松川浦の各標本については、張ら (2012) で得られた塩基配列データ (AB688143) を用い、張ら (2012) で示された塩基置換部位に基づいて 13 ハプロタイプ (UM1-13) の塩基配列を決定した。これらの塩基配列について MEGA7 (Version 7.026; Kumar et al. 2016) を用いて最尤法 (ML 法) により分子系統樹を作成した。外群として、同じトックリウミグモ科 *Ascorhynchoidea* の 2 種 *Ascorhynchus castelli* (KX535408) 及び *A. levissimus* (KX008311) の塩基配列を用いた。Find Best DNA/Protein Models により最適モデルを探索し、最も BIC 値の小さかった T92+G (BIC=3335.978) を最適モデルに採用した。ブートストラップ値については分子系統樹の各枝の結びつきについて 500 回のランダムサンプリングを行うことにより算出した。

さらに TCS (Version 1.12; Clement et al. 2000) を用いて再節約法 (MP 法) によりハプロタイプネットワーク図を作成した。また DnaSP (Version 6.12.3; Rozas et al. 2017) の DNA Divergence Between Populations を用いて標本間および標本内の塩基置換率を、Arlequin (Version 3.5.2.2; Excoffier and Lischer 2010) の AMOVA を用いて標本間の *Fst* 値を求めた。

結果

分子系統樹

張ら (2012) は、東京湾・三河湾・松川浦の 110 個体の mtDNA COI 領域の塩基配列から 13 ハプロタイプ (UM1-13) を検出した。本研究

では館山・三崎の 14 個体から新たに 7 ハプロタイプを検出したが、これらについて張ら (2012) の命名法を継承し、UM14-20 と定義付けた (Table 2)。三崎標本は 2 ハプロタイプ (UM14, UM15) から、館山標本は 6 ハプロタイプ (UM14, UM16-20) から構成され、いずれのハプロタイプも既知のハプロタイプ (UM1-13) と一致しなかった。得られた分子系統樹において、張ら (2012) で報告された 13 ハプロタイプ (UM1-13) と今回得られた 14 個体の配列は高いブートストラップ値を示して単系統群にまとまり、単一の種であることが示唆された (Fig. 2)。

ハプロタイプネットワーク

ハプロタイプネットワーク図から、館山標本と三崎標本のハプロタイプ (UM14-20) は UM11 以外の既知のハプロタイプ (UM1-UM13) と異なるグループを形成していることがわかった (Fig. 3)。2 つのグループはそれぞれ中心となるメインハプロタイプ (UM1, UM14) を有しており、互いに 6 塩基の置換があった。それぞれのグループはメインハプロタイプ (UM1, UM14) とメインハプロタイプから 1~2 塩基の置換があるサブハプロタイプ (UM2-UM10, UM12-13, UM16-20) で構成されていた。例外として、三崎標本の UM15 はメインハプロタイプの UM14 から 4 塩基の置換が観察された。

塩基置換率と *Fst* 値

館山及び三崎標本間の個体間平均塩基置換率は 0.301%、東京湾、三河湾及び松川浦標本間の個体間平均塩基置換率は 0.135%であった (Table 3)。また *Fst* 値は、三崎標本に対し東京湾・三河湾及び松川浦標本が、また館

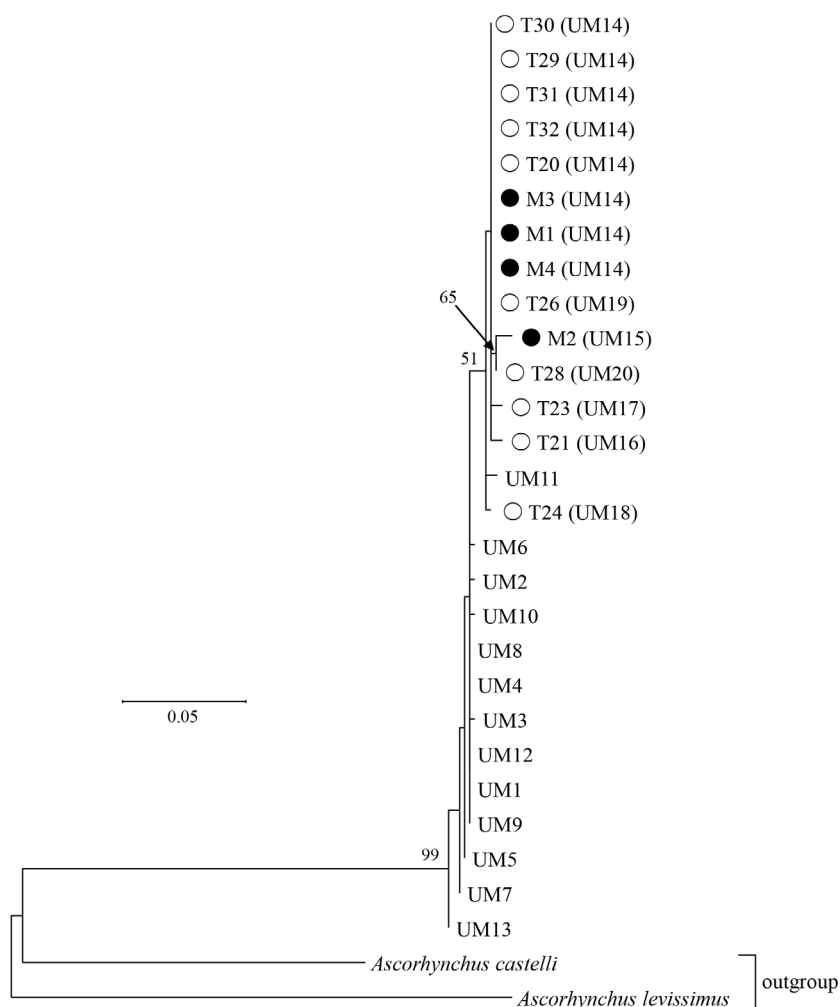


Fig. 2. A maximum likelihood (ML) tree of mtDNA COI sequences of *Nymphonella tapetis* specimens built based on T92+G model. *Ascorhynchus castelli* (KX535408) and *A. levissimus* (KX008311) are used as outgroup species. M1–13: haplotypes from previous study (Chow et al. 2012). UM14–20: haplotypes detected in the present study. Open and closed circles indicate ten individuals from Tateyama (T) and four individuals from Misaki (M), respectively. Bootstrap values less than 50 % are not shown.

山標本と東京湾・三河湾及び松川浦標本とで、有意な差 ($p < 0.01$) を示した (Table 4)。一方で、三崎標本と館山標本との間の F_{st} 値に有意差は見られなかった。

考察

日本産カイヤドリウミグモの種内系統

本研究による mtDNA COI ハプロタイプの解析の結果、国内産カイヤドリウミグモは、館山・三崎標本で検出されたハプロタイプで

Table 3. Nucleotide diversity (p-distance) within (on the diagonal) and between (below diagonal) local sample of *N. tapetis*. MU, Matsukawaura; TB, Tokyo Bay; MB, Mikawa Bay; MS, Misaki; TY, Tateyama.

	MU	TB	MB	MS	TY
MU	0.205				
TB	0.144	0.082			
MB	0.171	0.111	0.140		
MS	1.307	1.288	1.307	0.356	
TY	1.200	1.181	1.201	0.301	0.285

構成される系統と、東京湾・三河湾・松川浦標本で検出されたハプロタイプで構成される系

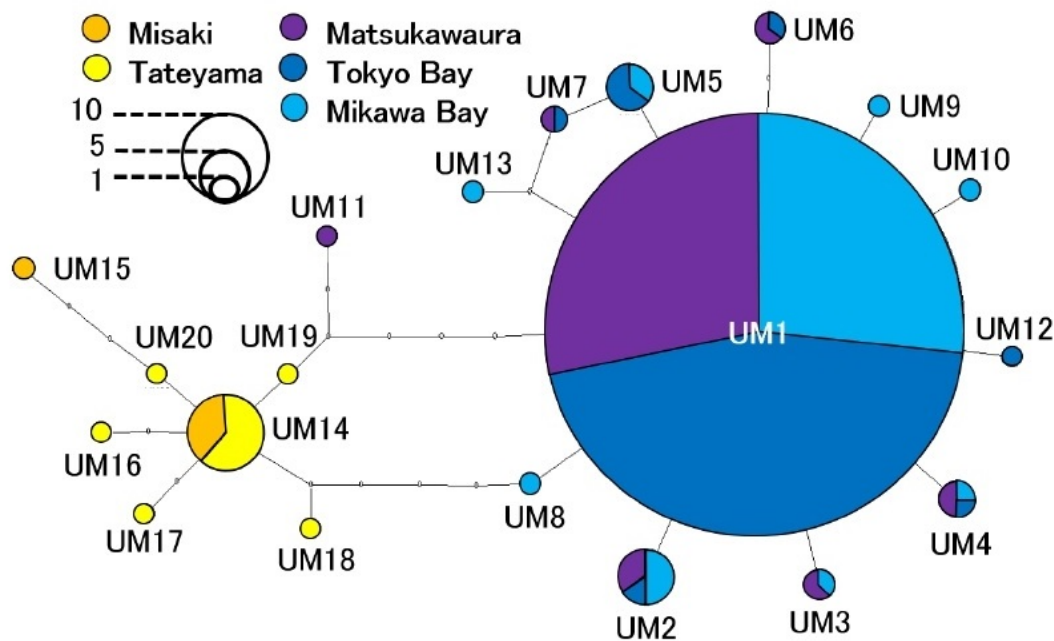


Fig. 3. Parsimony haplotype network based on COI haplotypes of 20 haplotypes (UM1–20). Circle colors indicate sampling locations, and size indicates number of individuals.

Table 4. Pairwise *Fst* values (below diagonal) and probability of pairwise *Fst* (above diagonal) between local samples of *Nymphonella tapetis*. Probability less than 0.01 is considered to be statistically significant (*). MU, Matsukawaura; TB, Tokyo Bay; MB, Mikawa Bay; MS, Misaki; TY, Tateyama.

	MU	TB	MB	MS	TY
MU		0.153 ± 0.039	0.694 ± 0.053	0 ± 0*	0 ± 0*
TB	0.012		0.234 ± 0.049	0 ± 0*	0 ± 0*
MB	-0.005	0.006		0 ± 0*	0 ± 0*
MS	0.827	0.918	0.873		0.546 ± 0.042
TY	0.811	0.897	0.852	-0.010	

統に分かれることが示された。以降、前者を「館山系統」、後者を「東京湾系統」と呼ぶことにする。

個体群間の遺伝的分化の程度を示す値である *Fst* 値が、三崎または館山標本に対し東京湾・三河湾及び松川浦標本がそれぞれ有意差を示したことから、また三崎標本と館山標本間で *Fst* 値に有意差が見られなかったことから、館山系統と東京湾系統の 2 系統は遺伝的に完全に隔離されているものと考えられた。

両系統の個体群動態

館山系統と東京湾系統の系統内の個体間平均塩基置換率は前者が 0.301 %、後者が 0.135 %と東京湾系統が低い値を示した。この値が低いことは、遺伝的多様性が低く遺伝的により均一で、その系統が成立してからの期間がより短いことを示す。さらに東京湾系統では、複数の COI ハプロタイプが単一の放射状ネットワーク構造内に混在している。これらの結果は、東京湾系統が移入などの個体数

変動によるボトルネック効果を受けており、小規模の同祖個体群から派生しているという張ら（2012）の考えを強く支持している。

また、館山系統は東京湾系統より遺伝的多様性が高いことから、比較的古い時代に成立し維持されてきた系統であることが示唆される。館山及び三崎ではこれまで成体のごく小規模な採集しか出来ていないことと合わせて考えると、宮崎・山田（2019）が推測したように、館山系統は東京湾などで大量発生が起こるずっと以前から局所的に小個体群を維持してきたと考えられる。一方で、館山系統の高い塩基置換率（0.301%）は、メインハプロタイプ（UM13）と UM15 との 4 塩基の置換を反映している可能性もある。UM15 を除いた館山系統の塩基置換率は 0.220% を示し、東京湾系統の塩基置換率より高いものの 0.301% から大きく減少した。このように館山系統では、個体数が少ないため遺伝的多様性を示す値が 1 個体に大きく依存してしまうことが課題である。今後個体数を追加することにより、より確度の高い考察が可能になると考えられる。

大発生集団の由来

カイヤドリウミグモの大発生が最初に確認されたのは、2007 年 4 月東京湾盤洲干潟であった。翌 2008 年には盤洲干潟の南方に位置する富津干潟及び、三河湾、翌々年の 2009 年には松川浦で、相次いで本種の大量発生が確認された（宮崎・山田 2019）。それぞれの地域間の距離や本種の分散能力の低さから、この一連の分布拡大が自然分散によるものとは考えられず、東京湾盤洲干潟を起点とした人為的移入による可能性が高いことが指摘されてきた（山田ら 2019）。この大発生の起点となっ

た東京湾盤洲干潟の個体群の由来を考察することは水産資源管理の点からも非常に意義深い。各地域の地理的位置関係からまず考えられるのは、館山の個体群が房総半島西側海岸に沿って盤洲干潟まで北上してきたという分布拡大経路の可能性である。しかし本研究により、東京湾盤洲干潟標本と館山標本が遺伝的に別々の系統に分かれることが明らかになったことから、この経路は否定される。山田ら（2019）は、本種の東アジアでの記録が日本以外には全く無いことから、国外からの移入の可能性を否定したが、その後韓国江原道東海市において 2001 年に本種の成体雄 3 頭が採集された記録が見つかった（Kim 2013）。よって本種の大陸からの移入の可能性も考えられる。また松川浦標本から検出したハプロタイプの 1 つ（UM11）はどちらの系統にも属さなかったが、館山系統により近いハプロタイプであることが示唆された。これについては松川浦の在来グループの個体を採集した例かもしれない。今後は国内の他地域に加え韓国を含む東アジア圏から広範囲かつ包括的なサンプリングを行い、移入経路を特定する必要がある。

今後の展開

本研究では、mtDNA COI 領域を使った解析により、日本国内のカイヤドリウミグモが 2 つの系統に分かれることを明らかにした。しかし用いた地域は国内 5 地域のみであり、かつ個体数も地域によっては数個体に留まっており、日本国内個体群の遺伝的分化の詳細を明らかにするには、地域・個体数共に更なる追加が必要である。山田ら（2019）によると、本種は大分県、岡山県、兵庫県、島根県からも発見されたことが報告されている。更に最近

では2019年3月に三重県「伊勢湾」でアサリへ寄生が確認されているほか（三重県水産研究所 2019）、前述したように韓国でも本種の生息が確認されている（Kim 2013）。今後これら未解析地域のサンプル入手が必要不可欠である。

また遺伝的構造の詳細を推し量るため、より解像度の高いDNAマーカーを適用することも必要である。我々は核遺伝子多型マーカーであるマイクロサテライトに着目し、すでに繰り返し配列長の違いに由来する19座の多型を検出することができるプライマーセットを開発済みである（宮崎ら 2019）。マイクロサテライト解析では祖先系統に由来する遺伝的多様性を比較的高解像度で検出することが可能であり、本種のように近年急激に増加が確認された生物種の集団構造の解析に適している。したがって、この解析を地域・個体数の追加と併せることにより、各地域の個体群の由来や移入経路の解明が期待できる。

謝辞

本研究で用いた標本の採集にあたっては、お茶の水女子大学湾岸生物教育研究センターの清本正人教授・吉田隆太特任助教・山口守技術専門職員、東京大学三崎臨海実験所の岡西政典特任助教・関藤守技術専門職員・幸塚久典氏技術専門職員の各氏より、施設・船舶・各種実験設備の利用について便宜を図っていただきと共に、様々なご指導をいただいた。以上の皆様に感謝申し上げます。

引用文献

張 成年・丹羽健太郎・岡本俊治・村内嘉樹・平井 玲・日比野 学・涌井邦浩・富山 毅・小林 豊・鳥羽光晴・狩野泰郎 (2012). カイヤドリウミグモ *Nymphonellata tapetis*

地域集団の遺伝的分化と分類学的位置. 日本水産学会誌 78: 895–902.

Clement, M., Posada, D., Crandall, K. A. (2000). TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol. Ecol.* 9: 1657–1660.

Dömel, J. S., Macher, T.-H., Dietz, L., Duncan, S., Mayer, C., Rozenberg, A., Wolcott, K., Leese, F., Melzer, R. R. (2019). Combining morphological and genomic evidence to resolve species diversity and study speciation processes of the *Pallenopsis patagonica* (Pycnogonida) species complex. *Front. Zool.* 16: 36.

Excoffier, L., Lischer, H. E. L. (2010). Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resources* 10: 564–567.

Kim, I.-H. (2013). Arthropoda: Pycnogonida: Pantopoda Sea Spiders. *Invertebrate Fauna of Korea* 21 (25). National Institute of Biological Resources, Incheon.

Krabbe, K., Leese, F., Mayer, C., Tollrian, R., Held, C. (2010). Cryptic mitochondrial lineages in the widespread pycnogonid *Colossendeis megalonyx* Hoek, 1881 from Antarctic and Subantarctic waters. *Polar Biol.* 33: 281–292.

Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis Version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33: 1870–1874.

三重県水産研究所 (2019). カイヤドリウミグモの寄生状況調査結果（平成31年2月22日～4月1日）. 2 pp. <https://www.pref.mie.lg.jp/common/content/000834951.pdf> (accessed 1 May 2020)

宮崎勝己・小林 豊・鳥羽光晴・土屋 仁 (2010). アサリに内部寄生し漁業被害を与えるカイヤドリウミグモの生物学. *タクサ* 28: 45–54.

宮崎勝己・山田勝雅 (2019). カイヤドリウミグモ研究の軌跡. *生物科学* 70: 66–72.

宮崎勝己・良永知義・山下桂司・中木 舞・神谷享子・恩地啓実・山田勝雅・望月佑一・玉置雅紀 (2019). 技法の開発：カイヤドリウミグモの早期発見と基礎生態. *生物科学* 70: 95–102.

Ohshima, H. (1935). A further note on *Nymphonella tapetis*: the egg-carrying mature male. *Ann. Zool. Japon.* 15: 95–102.

大島 廣 (1939). アサリに寄生するカイヤドリウミグモの生活史. *吉田博士祝賀記念誌* 3: 415–434.

Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J.

- C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S. E., Sánchez-Gracia, A. (2017). DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Mol. Biol. Evol.* 34: 3299–3302.
- Sabroux, R., Corbari, L., Krapp, F., Bonillo, C., Prieur, S. L., Hassanin, A. (2017). Biodiversity and phylogeny of Ammotheidae (Arthropoda: Pycnogonida). *Eur. J. Taxon.* 286: 1–33.
- Soler-Membrives, A., Linse, K., Miller, K. J., Arango, C. P. (2017). Genetic signature of Last Glacial Maximum regional refugia in a circum-Antarctic sea spider. *R. Soc. Open Sci.* 4: 1–16.
- 水産庁 (2009). 水産基盤調査委託事業報告書 (3) ウミグモ生態調査, および (4) ウミグモ駆除手法の検証. 51 pp. http://www.mf21.or.jp/suisankiban_hokoku/data/pdf/z0000853.pdf (accessed 1 May 2020)
- 鳥羽光晴・小林 豊・石井 亮・岡本 隆・村内 嘉樹・岡本俊治・山本直生・黒田伸郎・富山 毅・涌井邦浩・岩崎高資・張 成年・山本敏博・良永知義 (2019). カイヤドリウミグモによる漁業被害とその対策. *生物科学* 70: 78–88.
- 山田勝雅・張 成年・鳥羽光晴・良永知義・富山 毅・望月佑一・宮崎勝己 (2019). カイヤドリウミグモ研究のゆくえ. *生物科学* 70: 103–111.

Received: 4 April 2020 | Accepted: 2 May 2020 | Published: 3 May 2020